趋化因子受体 CX3CR1 对人肝癌细胞 7721 和 HepG2 的作用及其机制的研究[1]

范梦恬，陈思成，郭杨柳，李亚，孙艳婷，李汪，施琼△

（重庆医科大学检验医学院临床诊断教育部重点实验室，重庆 400016）

[摘 要] **目的：**探究趋化因子受体 CX3CR1（C-X3-C motif chemokine receptor 1，CX3CR1）对人肝癌细胞 7721 和 HepG2 增殖、迁移和侵袭的影响及其机制。**方法：**采用 Q-PCR 和 Western blot 法分别检测人正常肝细胞 LO2 和两种肝癌细胞（7721 和 HepG2）中 CX3CR1 的基因表达情况（mRNA 和蛋白质）；以过表达 CX3CR1 的质粒转染 7721 细胞，用抑制 CX3CR1 的干扰 RNA 转染 HepG2 细胞，通过 Q-PCR 和 Western blot 法检测 CX3CR1 的变化；应用 MTT 和流式细胞实验检测各组细胞的增殖能力；用集落形成实验检测各组细胞的自我更新和增殖能力；借助划痕愈合和 Transwell 检测各组细胞的迁移和侵袭能力；利用 Western blot 法检测 PI3K/AKT、MAPK/ERK 信号通路的激活情况。**结果：**CX3CR1 在 7721 细胞中 mRNA 和蛋白质呈低表达趋势，而在 HepG2 细胞中则呈高表达趋势；转染过表达 CX3CR1 质粒后 7721 细胞中 CX3CR1 的 mRNA 和蛋白水平有明显的升高，细胞的增殖、迁移、侵袭能力增强，p-AKT 和 p-ERK 水平升高；转染干扰 RNA 后 HepG2 细胞中的 CX3CR1 表达水平明显下降，增殖、迁移、侵袭能力减弱，p-AKT 和 p-ERK 水平降低。**结论：**趋化因子受体 CX3CR1 可以促进人肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力，该作用可能与 PI3K/AKT、MAPK/ERK 信号通路激活有关。

[关键词] CX3CR1；肝癌；增殖；迁移；侵袭

肝癌是我国发病率最高的恶性肿瘤之一。尽管目前治疗肝癌有手术、放疗、化疗等方法，但是因为原发性肝癌早期症状不明显，很多患者发现时已到中晚期，失去了手术治疗机会。放疗和化疗的使用又因为毒副作用大而疗效不佳，也受到了限制[1]。因此探究肝癌发生发展的机制、寻找新的治疗方法就显得尤为重要。

趋化因子是一类是指能够吸引白细胞移行到感染部位的一些低分子量的蛋白质，主要通过与其特定受体结合发挥生物学效应[2]。趋化因子受体根据其 N 端

1 **[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目（No.NSFC 81672103）

△通讯作者 Tel: 0371-68485239; E-mail: anniesq8718@aliyu.com

半胱氨酸的数目和间隔可以分为 C、CC、CXC、CX3C 四类，其中趋化因子受体 CX3CR1（C-X3-C motif chemokine receptor 1，CX3CR1）是 CX3C 家族已知的唯一成员，主要表达于 T 细胞、自然杀伤细胞、单核细胞、血管内皮细胞表面[3]。越来越多的研究表明，趋化因子及其受体在肿瘤的生长、侵袭、转移等方面发挥着重要的作用。已证实 CX3CR1 参与调节肾癌、胃癌、胰腺癌、骨肉瘤[4-7]等多种肿瘤的发生发展，但是关于其在肝癌中的作用及其机制的报道还比较少。

本研究选择在低表达细胞株中过表达 CX3CR1 在高表达细胞株中抑制 CX3CR1 两个方面探索 CX3CR1 对人肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响，并对其分子机制进行初步的探讨，为肝癌的治疗和预后判断提供新的依据。

材 料 和 方 法：

1 细胞培养及分组处理

人肝细胞癌7721、HepG2细胞株及人正常肝细胞LO2细胞株由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存备用。2种细胞均用含10% 胎牛血清的DMEM高糖完全培养基培养，置于37 ℃、5%CO2 的培养箱中培养。这2种细胞均贴壁生长，当融合度达80% 时，行常规胰酶消化传代。

2 主要试剂

过表达CX3CR1基因的质粒和表达绿色荧光蛋白的空载体质粒均购自上海吉凯基因化学技术有限公司，干扰CX3CR1基因的干扰RNA和阴性对照干扰RNA均购自广州市锐博生物科技有限公司。DMEM高糖培养基购自美国Hyclone公司。胎牛血清购自美国Gibco公司。Q-PCR试剂盒和Q-PCR引物购自日本TaKaRa公司。Lipo2000和TRIzol购自美国Invitrogen公司。MTT购自美国Sigma公司。基质胶购自美国Corning公司。兔抗人CX3CR1 单克隆抗体购自美国Abcam 公司。兔抗人AKT和ERK及磷酸化ERK（phosphorylated ERK，p-ERK），磷酸化AKT（phosphorylated AKT，p-AKT）单克隆抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司。鼠抗人β-actin 多克隆抗体购自美国Santa Cruz 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠和山羊抗兔IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。聚偏二氟乙烯（polyvinylidene difluoride，PVDF）膜、化学发光试剂盒购自美国Millipore 公司。Transwell 小室购自美国Corning公司。结晶紫购自温州东升化工公司。

3 实验方法

3.1 质粒转染及实验分组处理 首先收集对数生长期的肝癌细胞7721、HepG2及正常肝细胞LO2，进行Q-PCR 和蛋白质印迹法检测，以了解CX3CR1在这3种细胞中的表达情况。然

后采用质粒转染的方法过表达肝细胞癌7721细胞中CX3CR1 的基因水平：选择对数生长期的7721细胞，当细胞融合度达70% 时将培养基更换为没有血清和抗生素的双无DMEM培养基，通过助转剂Lipo2000将过表达CX3CR1质粒转染细胞，4h后将培养液换为新鲜的完全DMEM培养基；同时，以不转染和转染空载体质粒的7721细胞分别作为空白对照和阴性对照，以排除质粒载体本身对实验的影响。感染24h和48 h 后，在荧光显微镜（×100）下观察各组细胞中GFP的表达情况，以此来判断质粒转染程度。一般以转染后24h表达荧光的细胞百分数在30% ~50% 为宜，说明质粒转染成功。同时用干扰RNA处理HepG2细胞：选择对数生长期的HepG2细胞，当细胞融合度达70%时，转入干扰RNA，以不转染组和转染阴性对照干扰RNA作为空白对照和阴性对照。

3.2　Q-PCR法检测细胞中相关因子的mRNA表达　收集人正常肝细胞LO2、未转染的人肝癌细胞7721、转染空载质粒的7721细胞和转染过表达CX3CR1质粒48h的7721细胞、未转染的人肝癌细胞HepG2、转染阴性对照干扰RNA的HepG2细胞和转染干扰CX3CR1的干扰RNA48h的HepG2细胞，TRIzol法提取各组细胞的RNA，两步法逆转成cDNA后用Q-PCR法检测各组细胞CX3CR1的表达水平，Q-PCR反应体系为10μL，反应条件为：95℃ 30s；95℃ 5s，60℃ 30s，40个循环；72℃ 30s，实验重复3次。引物序列如下：

CX3CR1　Forward: CAACAGCAAGAAGCCCAAGAG

　　　　Reverse: TGAAGAAGAAGGCGGTAGTGAA

β-actin　Forward: CCACGAAACTACCTTCAACTCC

　　　　Reverse: GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT

3.3　蛋白质印迹法检测细胞中CX3CR1、AKT、p-AKT、ERK和p-ERK的蛋白表达水平　收集人正常肝细胞LO2、未转染的人肝癌细胞7721、转染空载质粒的7721细胞和转染过表达CX3CR1质粒48h的7721细胞、未转染的人肝癌细胞HepG2、转染阴性对照干扰RNA的HepG2细胞和转染干扰CX3CR1的干扰RNA48h的HepG2细胞，提取总蛋白，加入蛋白上样缓冲液后，煮沸10min至蛋白变性，BCA法测蛋白浓度，SDS-PAGE分离蛋白，转移蛋白至PVDF膜，5%BSA 37℃封闭2h，一抗4℃孵育过夜（稀释比例为：CX3CR1 1：500，AKT 1:1000, ERK 1：1000，p-AKT 1:1000, p-ERK 1:1000，β-actin 1:1000），洗膜，二抗37℃孵育1h（稀释比例为1:5000），洗膜，化学发光显影，Quantity one软件计算出各电泳条带的灰度值，并与内参β-actin的灰度值相比，得出各蛋白的表达水平，实验重复3次。

3.4　MTT法检测细胞增殖能力　收集对数生长期人肝癌细胞7721、HepG2，以2000个/孔（20000/mL）接种于96孔板中，每组设置5个平行孔。待细胞贴壁后，在7721细胞中转染

CX3CR1过表达质粒，在HepG2细胞中转染CX3CR1干扰RNA，此时记为0d，每孔加入10μL的MTT（5g/L），37℃孵育4h，弃去培养基，每孔加入150μL DMSO，轻摇震荡20 min后，用酶标仪在492 nm波长处检测每组各孔细胞吸光度值，继续培养细胞，并依次检测1d、2d、3d每组各孔细胞吸光度值，绘制出细胞增殖曲线，实验重复3次。

3.5 集落形成实验检测细胞自我更新和增殖能力 收集对数生长期人肝癌细胞7721、HepG2，以500个/孔接种于6孔板中，分别转染CX3CR1过表达质粒和干扰RNA， 15d后弃去每孔培养基，加入PBS清洗3遍，每孔加入1mL 4%多聚甲醛固定20min，弃去多聚甲醛，每孔加入1mL结晶紫染色30min，弃去结晶紫，加入PBS清洗3遍，干燥后扫板，计数大小在0.3-1mm之间的集落，实验重复3次。

3.6 流式细胞法检测细胞周期 将对数生长期人肝癌7721、HepG2细胞接种至6孔板中，细胞密度50%时分别转染CX3CR1过表达质粒和干扰RNA，48h后收集细胞，PBS清洗3遍，70%乙醇固定，加入PI/Triton X-100染色液，染色15min后，上流式细胞仪检测细胞周期，实验重复3次。

3.7 划痕实验检测细胞迁移能力 将对数生长期的人肝癌细胞7721、HepG2接种至6孔板中，细胞密度80%时分别转染CX3CR1过表达质粒和干扰RNA，24h后用10μL 小枪头行“一”字划痕，弃去培养基，PBS清洗3遍，每孔加入含2%血清的DMEM培养基，显微镜下、观察并照相，此时记为0h，继续培养48h、72h后在同一观察点观察划痕愈合情况并照相，通过计算多个观察点划痕宽度平均值，得出各组细胞划痕愈合率。划痕愈合率（%）=（0划痕宽度-72h划痕宽度）/0h 划痕宽度× 100%，实验重复3次。

3.8 Tanswell实验检测细胞迁移和侵袭能力 将转染过表达质粒48h后的人肝癌细胞7721、HepG2制成无血清细胞悬液，将含有40000个细胞的400μL 悬液加入上室的小室中（侵袭实验需铺基质胶，基质胶与DMEM培养基按1:10比例，铺32μL，细胞密度为80000/孔）下室中加入700μL 含10%血清完全DMEM培养基，每组设置4个平行对照，24h后取出小室，弃去培养基，PBS清洗3遍，用棉签轻轻拭去小室膜上未穿膜的细胞，500μL 4%多聚甲醛固定20min，弃去多聚甲醛，500μL 结晶紫染色30min，弃去结晶紫，PBS清洗3遍，干燥后于显微镜下计数，每个小室至少观察10个视野，计数后取平均值，实验重复3次。

4 统计学处理

采用SPSS 16.0 统计学软件对各实验结果进行统计分析。各实验均重复3 次，结果以均数±标准差表示，2组间差异比较采用*t*检验；3组或3组以上差异比较采用单因素方差分析，并用*Bonferroni*校正的t检验进行组内两两比较。以$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 趋化因子受体CX3CR1在人正常肝细胞LO2和人肝癌细胞7721、HepG2中的表达

Q-PCR和蛋白质印迹法检测结果显示，7721细胞中CX3CR1的mRNA和蛋白质表达水平与LO2细胞无明显差异，HepG2细胞中CX3CR1的mRNA和蛋白质表达水平较LO2细胞明显升高(a)。结果提示，趋化因子受体CX3CR1在正常人肝细胞LO2和人肝癌细胞7721中表达无明显差异，均呈低表达，在HepG2细胞中呈高表达趋势(b-c)，可以用于后续的基因过表达实验,见图1。

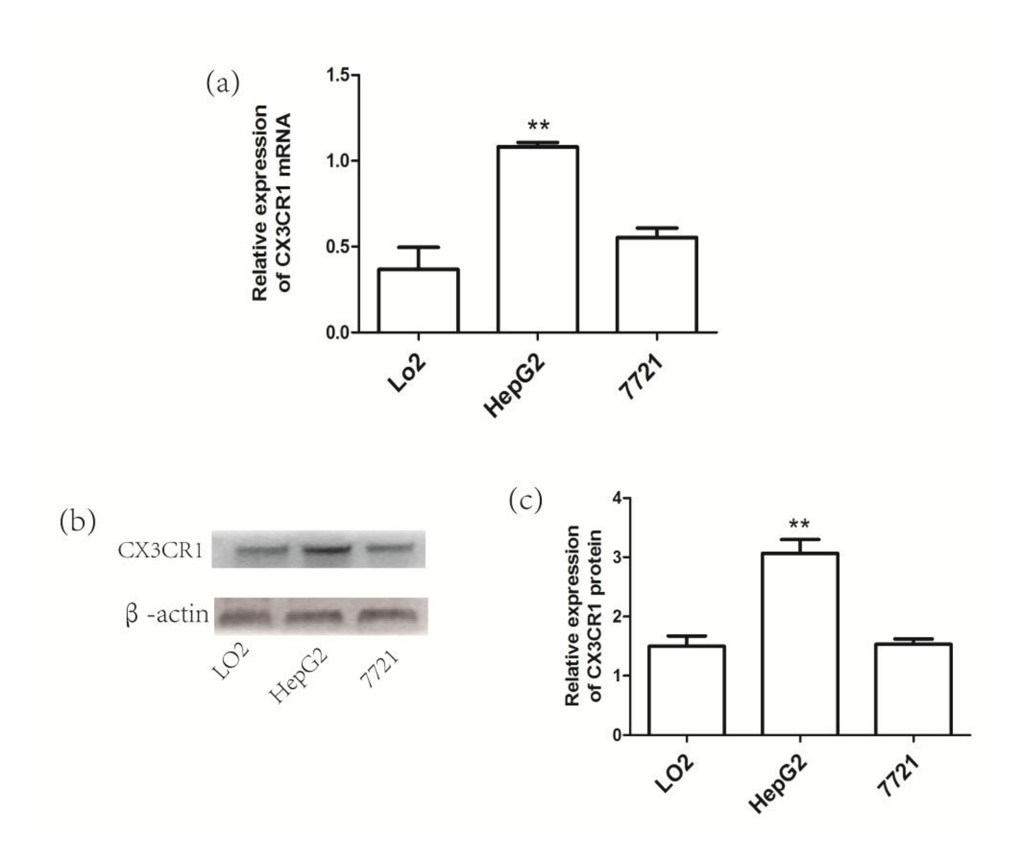


Figure 1. The expression of CX3CR1 at mRNA and protein levels in the LO2 HepG2 and 7721 cells. n=3. **P<0.01 vs LO2

图1 LO2细胞、HepG2细胞和7721细胞中CX3CR1的mRNA和蛋白质表达水平

2. CX3CR1过表达质粒和干扰RNA在7721、HepG2细胞中转染效果验证

分别将外源性的阴性对照质粒和过表达CX3CR1质粒转染7721细胞，24小时后转染效率达30%以上。Q-PCR及蛋白质印迹法检测结果显示，7721和HepG2细胞的空白对照组和阴性对照组相比，CX3CR1的mRNA和蛋白质表达水平之间差异无统计学意义，而7721细胞中CX3CR1过表达质粒转染组较阴性对照组的CX3CR1mRNA和蛋白质水平均显著升高（a-b P<0.001），HepG2细胞中CX3CR1

干扰RNA转染组较阴性对照组的CX3CR1mRNA和蛋白质水平均显著降低（c-g *P*<0.001）见图2。以上结果说明，CX3CR1过表达质粒和干扰RNA转染成功，可用于下一步的功能研究。

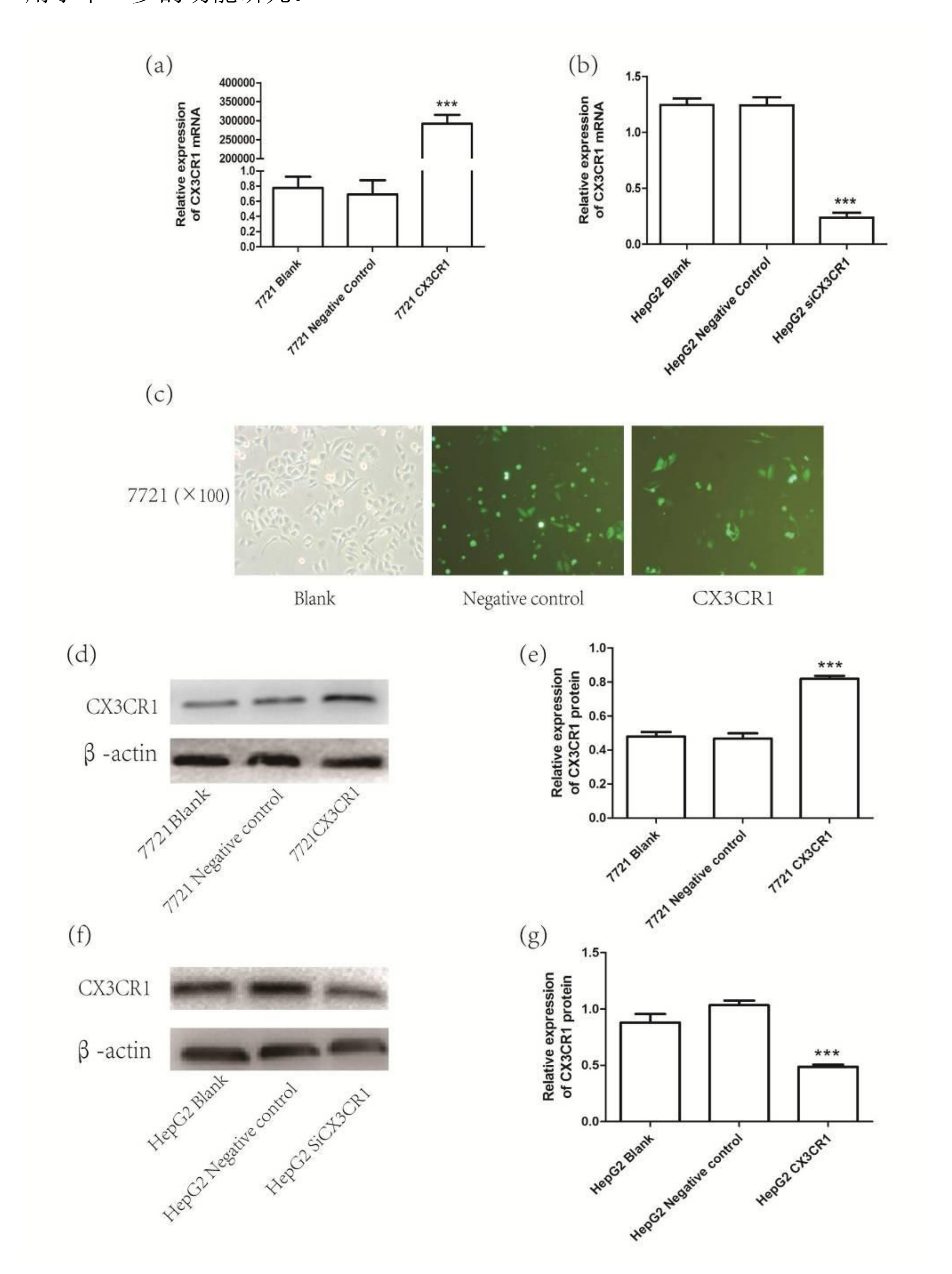


Figure 2. The mRNA and protein levels of　CX3CR1 was detectsd by transfecting over-expression plasmid in the 7721 cells and the siRNA in the HepG2 .Mean±SD. n=3. ***P<0.001 vs Negative control

图2　CX3CR1过表达质粒和干扰RNA在7721、HepG2细胞中转染效果验证

3. CX3CR1对7721、HepG2细胞增殖能力的影响

MTT结果显示，第0天时三组细胞的OD值无明显差异；第2天、第3天和第4天时，7721和HepG2细胞的空白对照组和阴性对照组之间细胞的OD值也无明显差异，但7721细胞中过表达CX3CR1质粒转染组细胞的OD值比阴性对照组明显增加(a P<0.01)，HepG2细胞中CX3CR1干扰RNA转染组细胞OD值比阴性对照组明显降低（b P<0.05）见图3。结果说明，过表达CX3CR1基因可以促进7721细胞的增殖，干扰CX3CR1基因可以抑制HepG2细胞的增殖。

集落形成实验结果显示，7721细胞中过表达CX3CR1质粒转染组与未转染空白对照组和转染空载体质粒的阴性对照组比较，集落形成的数目明显增加，(c-d P<0.001)，HepG2细胞中CX3CR1干扰RNA转染组较空白对照组和阴性对照组，集落形成的数目明显降低（e-f P <0.01）见图3。结果说明，过表达CX3CR1基因可以促进7721细胞的自我更新和增殖，而干扰CX3CR1可以抑制HepG2细胞的自我更新和增殖能力。

流式周期实验结果显示，7721细胞中过表达CX3CR1组较空白对照和阴性对照组比较，处于G1期细胞数明显减少，处于S期细胞数明显增多（g-h P <0.05），HepG2细胞中干扰CX3CR1组较空白对照和阴性对照比较，处于G1期细胞数明显增多，处于S期细胞数明显减少（i-j P <0.05）见图3.结果说明，过表达CX3CR1基因可以促进7721细胞的增殖，干扰CX3CR1基因可以抑制HepG2细胞的增殖。

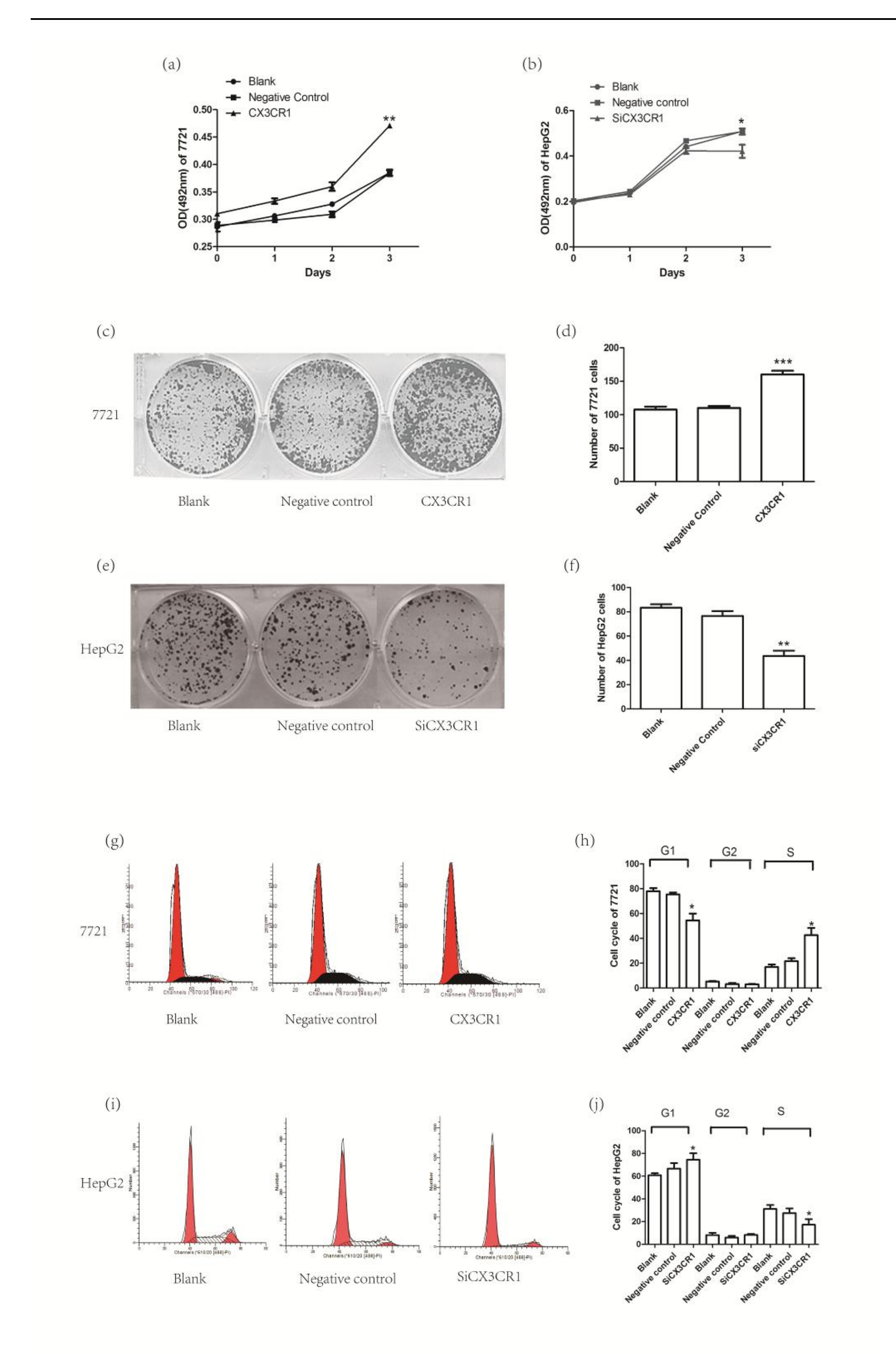


Figure 3. The effects of CX3CR1 on the proliferation abilty on the 7721 and HepG2 cells.Mean±SD. n=3. *p<0.05 vs Negative control**p<0.01 vs Negative control ***p <001 vs Negative control

图3 CX3CR1对7721和HepG2细胞增殖能力的影响

4. CX3CR1对7721、HepG2细胞迁移和侵袭能力的影响

Transwell迁移实验结果显示，7721细胞中未转染空白对照组穿过小室膜的细

胞数为（266±13）个，转染空载质粒的阴性对照组为（267±18）个，两组相比较差异无统计学意义；但过表达CX3CR1质粒转染组穿过小室膜的细胞数为（338±11）个，较阴性对照组明显增加(a-b $P<0.01$)，HepG2细胞中空白对照组穿膜细胞数为（311±13）个，与阴性对照组（338±50）个相比无统计学差异，CX3CR1干扰RNA转染组的细胞穿膜数为（163±9）个，较阴性对照组明显减少（c-d $P<0.01$）见图4。

Transwell侵袭实验结果显示，7721细胞中未转染空白对照组穿过基质胶的细胞数为（140±9）个，转染空载质粒的阴性对照组为（139±10）个，两组相比较差异无统计学意义；但过表达CX3CR1质粒转染组穿过基质胶的细胞数为（230±28）个，较阴性对照组明显增加(e-f $P<0.01$)，HepG2细胞中空白对照组穿过基质胶的细胞数为（60±8）个，与阴性对照组（55±8）个相比无统计学差异，CX3CR1干扰RNA转染组穿过基质胶的细胞数为（27±5）个，较阴性对照组明显减少（g-h $P<0.01$）见图4。

划痕愈合实验结果显示，7721细胞中未转染空白对照组48h的划痕愈合率为(54±5)%,与转染空载质粒的阴性对照组（47±4）%相比，差异无统计学意义；但过表达CX3CR1质粒转染组的划痕愈合率为（83±4）%，较阴性对照组明显提高(i-j $P<0.001$)，HepG2细胞中空白对照组48小时划痕愈合率为（54±9）%与阴性对照组（53±8）%相比无统计学差异，CX3CR1干扰RNA转染组的划痕愈合率为（31±6）%，较阴性对照组明显降低（k-l $P<0.05$），见图4。以上结果说明，CX3CR1过表达可以促进7721细胞的迁移和侵袭，CX3CR1干扰可以抑制HepG2细胞的迁移和侵袭能力。

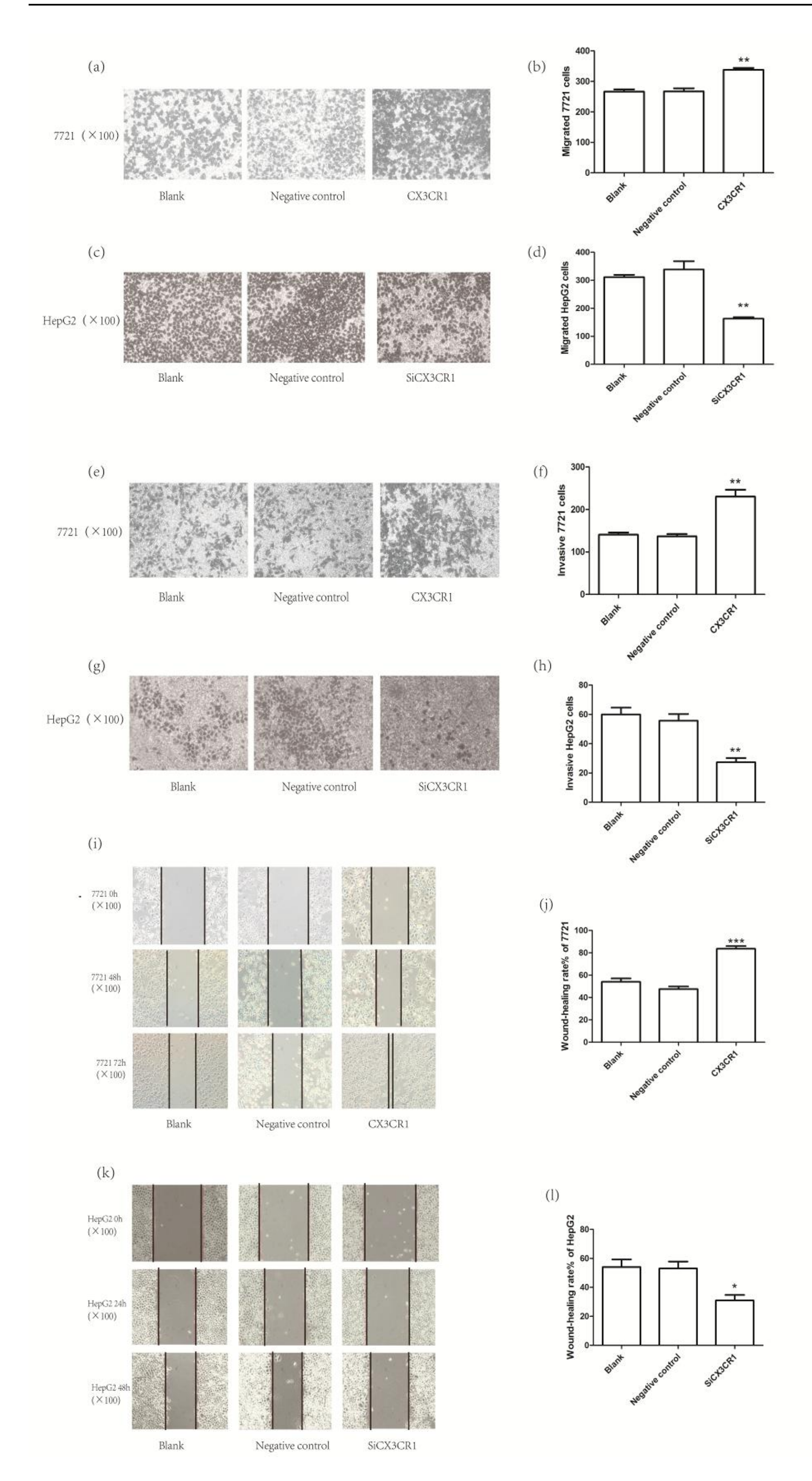


Figure 4. The effects of CX3CR1 on the migration and invasion abilty on the 7721 and HepG2 cells.Mean±SD. n=3. *p<0.05 vs Negative control **p<0.01 vs Negative control ***p <001 vs Negative control

图4 CX3CR1对7721和HepG2细胞迁移和侵袭能力的影响

5.　**过表达和干扰CX3CR1对PI3K/AKT 和MEK/ERK信号通路的影响**

蛋白质印迹法检测结果显示，7721细胞中未转染的空白对照组和转染空载质粒的阴性对照组相比，p-ERK、p-AKT水平没有统计学差异,而过表达CX3CR1质粒转染组的p-ERK、p-AKT水平较阴性对照组明显升高(a)，HepG2细胞中空白对照组和阴性对照组相比，p-ERK、p-AKT水平没有统计学差异,而CX3CR1干扰RNA转染组的p-ERK、p-AKT水平较阴性对照组明显降低(b)，见图5。以上结果说明PI3K/AKT 和MEK/ERK信号通路可能参与CX3CR1调节肝癌发生发展的过程。

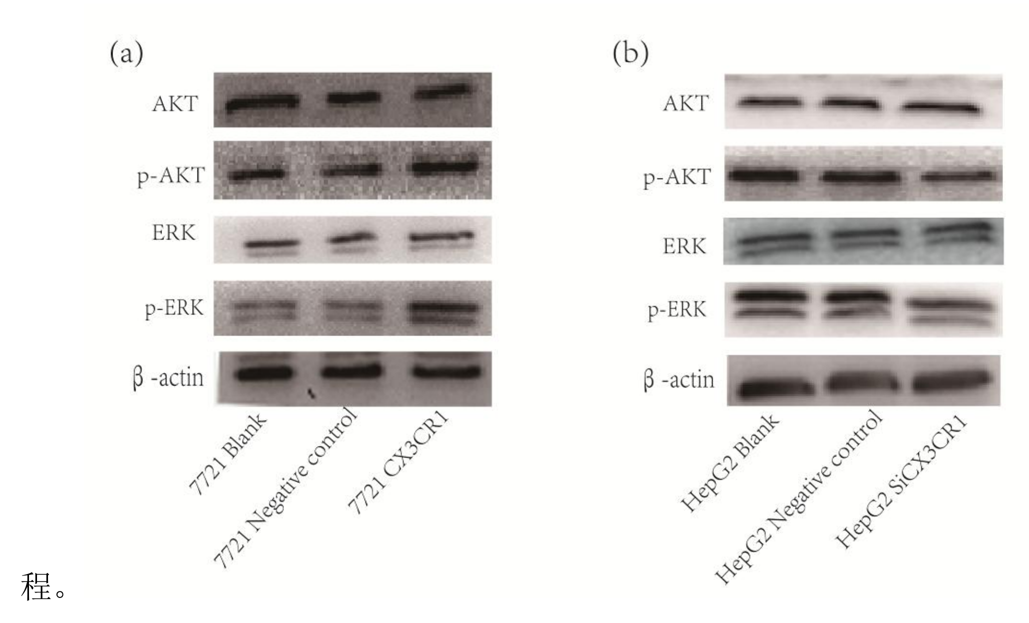


Figure 5. The level of p-ERK p-AKT in the 7721 and HepG2 cells after transfecting.Mean±SD.n=3.***p<0.001 vs Negative control

图5　Western blot 检测过表达后7721和HepG2细胞中p-ERK、p-AKT的表达水平

讨　论

肝癌是中国发病率最高的恶性肿瘤之一，每年死于肝癌的患者高达74.5万例[8]，肝癌的发生和发展是一个多因素参与的复杂过程，虽然目前治疗肝癌有手术、放疗、化疗等方法，但是因为肝癌早期发病症状隐匿，大多数患者就医时已处于中晚期，失去了手术治疗的机会[9]，随着人们对肝癌的研究逐渐加深，趋化因子及其受体在肝癌发生、发展中的作用越来越被重视， CXCL12-CXCR4、CCL20-CCR6、 CCL5、CCL22-CCR4[10-13]等趋化因子轴都被证实能促进肝癌的增殖、迁移、侵袭。CX3CR1作为趋化因子受体中的一员，也被证实参与调节多种肿瘤的生物学效应，例如在前列腺癌中高表达CX3CR1可以促进前列腺癌的迁移和骨转移能力[14]，在非小细胞肺癌组织中也检测出高表达的CX3CR1，而抑制

掉CX3CR1后可以提高非小细胞肺癌患者的生存率和化疗敏感性[15]。而关于CX3CR1在肝癌中的研究则鲜有报道。

本研究发现，CX3CR1在不同的肝癌细胞株中差异性表达，本研究采用CX3CR1过表达质粒转染7721细胞，使其过表达CX3CR1，而用CX3CR1干扰RNA转染HepG2细胞，抑制其CX3CR1的表达，高表达CX3CR1的7721细胞增殖、迁移、侵袭能力显著增强，同时p-AKT和p-ERK水平显著增高，抑制CX3CR1的HepG2细胞增殖、迁移、侵袭能力明显减弱，同时p-AKT和p-ERK水平显著降低说明PI3K/AKT、MAPK/ERK信号通路参与了CX3CR1调节肝癌发生发展的过程。

综上所述，过表达CX3CR1可以明显促进肝癌细胞7721的增殖、迁移和侵袭能力，干扰CX3CR1可以明显抑制HepG2细胞的增殖、迁移和侵袭能力，其机制可能与激活PI3K/AKT、MAPK/ERK信号通路有关，由此可见CX3CR1可能成为潜在的治疗肝癌的新靶点，为临床治疗提供一点新的思路，并且CX3CR1在不同肝癌细胞株中差异性表达的特点，可能可以为临床预后的判断提供一些帮助。

Effect of CX3CR1 on human hepatocellular carcinoma cells and its mechanism

FAN Meng-tian，CHEN Si-cheng，GUO Yang-liu，LI Ya，SUN Yan-ting，LI wang，SHI Qiong

（Key laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Ministry of Education, College of Laboratory Me-dicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China E-mail: anninesq8718@aliyun.com）

[ABATRACT]:AIM: To investigate the effect of CX3CR1 on the proliferation migration and invasion abilities of hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines and its mechanism. **METHODS**: The expression of CX3CR1 at mRNA and protein levels of 7721, HepG2 and human normal liver epithelial cells L02 was detected by Q-PCR and Western blot. The 7721 cells were transfected with the overexpression plasmid of CX3CR1;the HepG2 cells were transfected with siRNA of CX3CR1, and the expression of CX3CR1 at mRNA and protein levels were detected by Q-PCR and Western blot. The cell proliferation ability was detected by MTT and clone formation assay. The migration and invasion ability were detected by Wound-healing and Transwell assays. The protein levels of

PI3K/AKT and MAPK/ERK were detected by Western blot. **RESULTS**: The expression of CX3CR1 was lower in 7721 cells than that in HepG2 cells . After overexpression plasmid was transfected into 7721 cells ,the expression of CX3CR1 was up-regulated; cell proliferation migration and invasion abilities were increased. Meanwhile, the levels of p-ERK and p-AKT were up-regulated. After siRNA was thansfected into HepG2 cells ,the expression of CX3CR1 was down-regulated ,and cell proliferation, migration and invasion abilities were decreased, with the levels of p-ERK and p-AKT down-regulated. **CONCLUSION**: CX3CR1 can promote the proliferation, migration and invasion abilities of hepatocellular carcinoma(HCC) cells. The activation of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathway may play an important role in these processes.

[KEY WORDS]: CX3CR1;Hepatocellular carcinoma; Proliferation; Invasion; Migration

参考文献

[1]. Moriguchi M. Umemura A.Current status and future prospects of chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. Clin J Gastroenterol, 2016, Aug;9(4):184-90.

[2]. Kufareva I.Chemokines and their receptors: insights from molecular modeling and crystallography. Curr Opin Pharmacol, 2016, Jul 23;30:27-37

[3]. F Huang，XP Geng.Chemokines and hepatocellular carcinoma.World Journal of Gastroenterology,2010, 16(15):1832-6

[4]. Ren H, Zhao T, Sun J.The CX3CL1/CX3CR1 reprograms glucose metabolism through HIF-1 pathway in pancreatic adenocarcinoma. J Cell Biochem,2013, 114(11):2603-11

[5]. Yao X, Qi L, Chen X.Expression of CX3CR1 associates with cellular migration, metastasis, and prognosis in human clear cell renal cell carcinoma.Urologic Oncology,2013, 32(2):162-170

[6]. Lv CY, Zhou T, Chen W .Preliminary study correlating CX3CL1/CX3CR1 expression

with gastric carcinoma and gastric carcinomaperineural invasion. World Journal of Gastroenterology Wjg, 2014, 20(15):4428-4432

[7]. Liu JF, Tsao YT, Hou CH.Fractalkine/CX3CL1 induced intercellular adhesion molecule-1-dependent tumor metastasis through the CX3CR1/PI3K/Akt/NF-κB pathway in human osteosarcoma. Oncotarget, 2016, Aug 12

[8]. Shao Y, Guan JZ. Advances in the treatment of primary liver .Infectious Disease Information. 2016,29（4）：248-252

[9]. Brunot A, Le Sourd S. Hepatocellular carcinoma in elderly patients: challenges and solutions.J Hepatocell Carcinoma,2016, Jun 17;3:9-18

[10]. Shah AD. Bouchard MJ.Interstitial Fluid Flow Increases Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion through CXCR4/CXCL12 and MEK/ERK Signaling. PLoS One,2015, Nov 11;10(11):e0142337

[11]. Du D, Liu Y. The effects of the CCR6/CCL20 biological axis on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. Int J Mol Sci, 2014, Apr 16;15(4):6441-52

[12]. Sadeghi M, Lahdou I.Serum levels of chemokines CCL4 and CCL5 in cirrhotic patients indicate the presence of hepatocellular carcinoma. Br J Cancer, 2015, Sep 1;113(5):756-62

[13]. Yeung OW, Lo CM. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. J Hepatol, 2015, Mar;62(3):607-16

[14]. Jamieson WL. CX3CR1 is expressed by prostate epithelial cells and androgens regulate the levels of CX3CL1/fractalkine in the bone marrow: potential role in prostate cancer bone tropism. Cancer Res, 2008, Mar 15;68(6):1715-22

[15]. Wen Luo, Yuanlong Lin. miRNA-296-3p modulates chemosensitivity of lung cancer cells by targeting CX3CR1. Am J Transl Res, 2016, 8(4): 1848–1